

Experimentelle Untersuchungen zur
Hyaluronidasehemmung durch Adrenochrom
bei intakten und
adrenalektomierten Ratten

von

BERND / SCHULTZE

München

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Experimentelle Untersuchungen zur Hyaluronidasehemmung
durch Adrenochrom bei intakten und
adrenalektomierten Ratten

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernd Schultze
aus

Hildburghausen /Thüringen

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. R. Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.3.1964

Meinem Freunde Heinrich Schüzler

Inhaltsverzeichnis

Problematik	5
Eigene Untersuchungen	8
Methodik	8
Versuchsreihen	9
Statistische Auswertung	10
Tabellenanhang	17
Diskussion	26
Zusammenfassung	28
Literaturverzeichnis	29

Problematik

Gestützt auf die Ergebnisse früherer Arbeiten konnten Mathies und Mitarbeiter nachweisen, daß antirheumatisch wirkende Substanzen wie Phenylbutazon¹, Salicylate^{2, 3}, Chloräthylbenzmethoxazon⁴, die Nebennierenrindensteroid⁵, im Moor enthaltene Substanzen⁶⁻¹⁰ und Bienengift¹¹ zu einer Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität führen.

Die Hyaluronidasehemmung trat in Versuchen an adrenaletomierten Tieren nicht auf^{1, 4, 12, 5, 13, 7, 11}, war aber in Versuchen an hypophysektomierten Ratten erhalten^{1, 4, 12, 5, 13, 7, 11}. Damit war zunächst die Notwendigkeit der Nebennieren für das Zustandekommen der Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität erwiesen. Eine Aussage, ob das Nebennierenmark oder die Nebennierenrinde oder beide gemeinsam für den Eintritt der Hyaluronidasehemmung notwendig sind, konnte auf Grund dieser Versuche noch nicht gemacht werden.

Sayers und Sayers¹⁴ hatten durch Versuche zeigen können, daß der Ascorbinsäuregehalt der Nebennieren beim Stress vermindert wird. Diese sogenannte Ascorbinsäuredepletion ist als Aktivierung der Nebennierenrinde zu werten.

Bei intakten Ratten stellt sich eine solche Ascorbinsäuredepletion nach Verabreichung von antirheumatischen Substanzen ein^{15, 13}, es kommt also zu einer Aktivierung der Nebennierenrinde durch die Antirheumatika^{15, 13}. Domenjoz¹⁵ und Mathies¹³ unterwarfen nun hypophysektomierte Ratten den gleichen Versuchsbedingungen und stellten ein Ausbleiben der Ascorbinsäuredepletion fest, gleichzeitig aber war der hyaluronidasehemmende Effekt der Antirheumatika erhalten geblieben. Als Ergebnis dieser Versuche kann also gelten, daß die Nebennierenrinde zwar durch Antirheumatika auf dem Wege hormoneller Stimulierung über die Hypophyse aktiviert wird, daß aber die Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität allein an das Nebennierenmark ohne Mitwirkung der Hypophyse oder der Neben-

nierenrinde gebunden ist.

Diese Tatsache wurde durch weitere Untersuchungen von Mathies und Mitarbeitern^{3, 16} belegt. Sowohl bei intakten als auch bei adrenaletomierten Ratten war eine Hyaluronidasehemmung durch die Applikation von Katecholaminen (Adrenalin und Noradrenalin) zu erreichen. Waren nun die Katecholamine als Wirkstoffe des Nebennierenmarkes für die Hemmung der Hyaluronidasewirkung verantwortlich, so mußte ihre Wirkung durch Adrenolytika aufgehoben und ihre Ausschüttung aus dem Nebennierenmark durch Ganglienblocker verhindert werden können. Versuche mit Ergotamintartrat als Sympathikolytikum erbrachten eine Aufhebung der Katecholaminwirkung hinsichtlich der Hyaluronidasehemmung, auch die Wirkung der Antirheumatika auf die Hyaluronidasehemmung war aufgehoben³. Ganglienblocker wie Pendiomid hatten letztere Wirkung auch^{17, 11}, ein Einfluß auf direkt applizierte Katecholamine war aber nicht zu verzeichnen, damit konnte ein Angreifen der Ganglienblocker peripher vom Nebennierenmark ausgeschlossen werden.

Nach Mathies¹⁶ setzt die hyaluronidasehemmende Wirkung der Katecholamine erst nach Abklingen der pharmakologisch bekannten sympathikomimetischen Wirkung ein, wie durch Messung der Pupillenweite gefunden wurde. Auch bei Dauerinfusion von 2 Stunden bei adrenaletomierten Versuchstieren zeigte sich eine Hyaluronidasehemmung erst längere Zeit nach Absetzen der Infusion¹⁸. Es wurde daher angenommen, daß kein direkter Effekt vorliegt. Wäre der Eintritt der Hyaluronidasehemmung an das Vorhandensein von Abbauprodukten der Katecholamine gebunden, so hätte sich bei den Infusionsversuchen eine Wirkung zeigen müssen, da sich im Verlauf von zwei Stunden genügend Metaboliten ansammeln müssen. Eine vagale Gegenreaktion konnte für die Erklärung des verzögerten Wirkungseintritts unwahrscheinlich gemacht werden, da bei adrenaletomierten Ratten Acetylcholin als Parasympathikomimeticum keine Wirkung auf die Hyaluronidase-Aktivität zeigt¹⁹. Danach lag die Vermutung nahe, daß das Absinken eines vorübergehend erhöhten Katecholaminspiegels den hyaluronidasehemmenden Effekt bewirkt. Diese Annahme konnte durch die zusätzliche Injektion von Adrenalin während einer Adrenalin-Dauerinfusion bei adrenaletomierten Tieren belegt werden¹⁸. Noch während der Dauerinfusion trat nach Verabreichung der sogenann-

ten Adrenalin spitzen in einem bestimmten Abstand die Hyaluronidase-Hemmung auf. Der Effekt wurde also nicht nur durch ein Absinken des Katecholaminspiegels auf das Normalniveau, sondern schon durch eine relative Niveaudifferenz erzielt.

In früheren Arbeiten war bereits nachgewiesen worden, daß sich das Adrenochrom, ein Abbauprodukt des Adrenalin, hinsichtlich der Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität bei intakten Ratten ähnlich wie Adrenalin verhält ^{20, 21}, und daß diese Wirkung durch Ganglienblocker, Sympathikolytika und Adrenalektomie teilweise zu blockieren ist.

In dieser Arbeit soll die Wirkung des Adrenochroms auf das Hyaluronidase-Spreading in verschiedenen Versuchsanordnungen an intakten und adrenaletomierten Ratten unter Verwendung von Pendiomid als Ganglienblocker und von Ergotamintartrat als Sympathikolytikum untersucht werden, um einen näheren Einblick in die vorliegenden Verhältnisse zu gewinnen.

Eigene Untersuchungen

1) Methodik

Die vorliegenden Versuche wurden an männlichen weißen Ratten im Gewicht von 180 bis 205 g durchgeführt. Für die Untersuchungen an adrenaletomierten Tieren wurden 2 Tage vor Versuchsbeginn die Nebennieren entfernt. Von einem Fellschnitt in der Medianlinie des Rückens aus wurde beiderseits des M. erector trunci eingegangen, die Nebennieren aus dem umgebenden Fettgewebe präpariert und retroperitoneal entfernt. Nach sorgfältigen Verschluss der beiden Muskelschnitte wurde der Fellschnitt vernäht und jodiert. Die Ernährung der adrenaletomierten Tiere bestand bis zum Versuchsbeginn aus Haferflocken, Zucker und physiol. Kochsalzlösung, sie wurden bei möglichst konstanter Raumtemperatur in mit Zellstoff gepolsterten und abgedeckten Behältern gehalten, um eine Auskühlung zu vermeiden.

Um unerwünschte und unkontrollierbare Stress-Einflüsse auszuschalten und um einen exakten Verlauf der Versuche mit Applikation der Testsubstanzen und genauer Registrierung der Ergebnisse zu garantieren, wurden die Tiere vor Versuchsbeginn narkotisiert. Es wurde eine Lösung von 5 mg Evipan-Natrium in 5 ccm frisch hergestellt und den Versuchstieren 0,2 ccm pro 100 g Körpergewicht am Rücken subcutan injiziert. Nach W i l h e l m i ²² besteht kein Einfluß der Barbiturate auf die Aktivität der Hyaluronidase.

Nach Eintritt der Narkose wurde die Bauchhaut der Ratten mit Pilca enthaart, wobei besonders darauf geachtet wurde, die obersten Epithelschichten nicht zu verletzen. Zum Zwecke der Versuchsplanung wurde die Bauchhaut in ein Versuchsfeld mit 6 Lokalisationsmöglichkeiten eingeteilt. Um Einflüsse der Lokalisation auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden, wurden die einzelnen Versuchsreihen nach dem Prinzip des "lateinischen Quadrates" geplant.

Zwei verschiedene Quaddeltypen wurden genau nach dem Zeitplan der Versuche intrakutan gesetzt. Die Farbstoffquaddel (F) enthielt 0,1 ccm einer 0,06%igen Evansblue-Lösung, die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel (FH) zusätzlich 7,5 Einheiten Hyaluronidase.

Fv und FHv wurden vor, Ft und Fht wurden zu den festgelegten Zeiten

nach Belastung der Tiere mit der Testsubstanz gesetzt. Nach 10 Minuten wurde die Farbstoffausbreitung der Quaddeln in der Bauchhaut in der äußersten Kontur auf einen Zelluloidstreifen übertragen, planimetriert und in mm^2 angegeben. Die Testsubstanz wurde mit einer Kanüle Nr. 20 i.v. injiziert, nachdem die Femoralvene in der Leistenbeuge freigelegt worden war.

Da das Spreading zweiphasig verläuft, ist nach *M a d i n a v e i t i a* ²³ nur die Ausbreitung in den ersten 10 Minuten als sicherer Hyaluronidase-Effekt zu bewerten.

2) Versuchsreihen

Versuchsreihe I

Bei 6 intakten Ratten von 180 bis 205 g Gewicht wurden vor Gabe der Testsubstanz zunächst zur Bestimmung des Leerwertes je eine Farbstoff- und eine Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel gesetzt und nach 10 Minuten abgelesen. Darauf folgte die intravenöse Injektion von 6 γ Adrenochrom pro 100 g Tiergewicht. Die verwendete Lösung enthielt 24 mg Adrenochrom in 100 ccm physiol. Kochsalzlösung. 15 Minuten nach Belastung mit Adrenochrom wurde das zweite, 90 Minuten nach Belastung das dritte Quaddelpaar gesetzt. Die Flächenausbreitung wurde jeweils nach 10 Minuten gemessen. Die Versuchsergebnisse gehen aus Tabelle 1 hervor.

Versuchsreihe II

6 intakte Ratten erhielten, nachdem die beiden Leerquaddeln gesetzt waren, 5 mg Pendiomid pro 100 g Tiergewicht i.v. 30 Minuten nach der Pendiomid-Injektion erfolgte die Gabe von 6 γ Adrenochrom pro 100 g Tier i.v. Die beiden folgenden Quaddelpaare wurden 15 und 90 Minuten nach der Adrenochrom-Applikation gesetzt und nach 10 Minuten abgelesen. Die gemessenen Werte stehen in Tabelle 2.

Versuchsreihe III

6 adrenaletomierten Ratten wurde nach Bestimmung des Leerwertes 6 γ Adrenochrom pro 100 g Tiergewicht i.v. injiziert. Jeweils 15 und 90 Minuten danach wurden die beiden folgenden Quaddelpaare gesetzt. Die Ergebnisse stehen in Tabelle 3.

Versuchsreihe IV

6 adrenaletomierten Ratten wurde nach Ablesen der Vergleichsquaddeln 5 mg Pendiomid pro 100 g Tiergewicht i.v. injiziert. 30 Minuten darauf wurden 6 γ Adrenochrom pro 100 g Tiergewicht i.v. appliziert. Versuchszeiten für die beiden folgenden Quaddelpaare waren auch hier 15 und 90 Minuten nach Adrenochromgabe. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 4 zu ersehen.

Versuchsreihe V

6 adrenaletomierten Ratten wurde nach Registrierung der Vergleichsquaddeln 0,8 mg Ergotamintartrat (Gynergen) pro 100 g Tiergewicht subcutan gespritzt. 20 Minuten danach erfolgte die Belastung mit 6 γ Adrenochrom pro 100 g Tiergewicht. Versuchszeiten der beiden Quaddelpaare waren 15 und 90 Minuten nach Adrenochromgabe. Die Ergebnisse stehen in Tabelle 5.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

1. Statistische Methodik

Wir sind bei der statistischen Auswertung der hier besprochenen Versuche von einem linearen statistischen Modell ausgegangen. In diesem linearen statistischen Modell wird angenommen, daß der Meßwert x_{ik} am i-ten Versuchstier unter dem k-ten Verfahren in 1. Näherung wie folgt dargestellt werden kann:

$$x_{ik}^{(j)} = T_i + V_k + L_j + \mu + \varepsilon_{ik}.$$

Hierin bedeutet T_i eine Konstante, die nur von dem i-ten Versuchstier abhängt, V_k eine Konstante, die nur von dem k-ten Verfahren abhängt und L_j eine Konstante, die nur von der j-ten Lokalisation abhängt. μ ist eine universelle Konstante, die für die Interpretation der Versuche keinerlei Bedeutung hat und lediglich aus Gründen der statistischen Methodik eingeführt wird. ε_{ik} ist der "Versuchsfehler", d.h. die Abweichung zwischen dem tatsächlich beobachteten Wert und demjenigen Wert, der auf Grund des statistischen Modelles zu erwarten ist: dem sog. "Erwartungswert". Von dem Versuchsfehler ε_{ik} wird angenommen, daß er eine Zufallsvariable darstellt, deren Verteilung unabhängig von den Versuchstieren, den Verfahren und den Lokalisationen ist; es wird angenommen, daß die Verteilung dieser

Zufallsvariablen eine Normalverteilung mit dem Erwartungswert 0 und der Varianz σ^2 ist.

Die Schätzung des Versuchsfehlers, d.h. der Varianz σ^2 erfolgt mit Hilfe von Varianz-Analysen. Die Rest-Varianz dieser Varianz-Analysen stellt die Schätzung des Versuchsfehlers dar.

In den Varianz-Analysen werden außerdem die folgenden Hypothesen geprüft:

Hypothese H_1 : Es bestehen keine Unterschiede zwischen den individuellen Reaktionsniveaux der einzelnen Versuchstiere, d.h. es ist

$$T_1 = T_2 = \dots = T_6.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Tieren" geprüft.

Hypothese H_2 : Es bestehen keine Unterschiede zwischen den Wirkungen der einzelnen Verfahren, d.h. es ist

$$V_1 = V_2 = \dots = V_6.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Verfahren" geprüft.

Hypothese H_3 : Die Lokalisationen innerhalb des Versuchsfeldes haben keinen Einfluß auf den Ausgang des Versuches, d.h. es ist

$$L_1 = L_2 = \dots = L_6.$$

Die Prüfung dieser Hypothese erfolgt mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Lokalisationen".

Im einzelnen erfolgt die Prüfung der Hypothesen durch Vergleich der angegebenen Varianz-Komponenten mit dem "Versuchsfehler", d.h. mit der Rest-Varianz. Der Vergleich dieser beiden Varianz-Komponenten wird mit Hilfe des F-Tests (Varianz-Quotienten-Test) durchgeführt. Die Hypothesen werden nur dann verworfen, wenn der errechnete Varianz-Quotient in der zugehörigen F-Prüfverteilung eine Überschreitungswahrscheinlichkeit besitzt, die mindestens 5% beträgt. Diese Überschreitungswahrscheinlichkeit ist zugleich die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der behauptet wird, die betreffende Hypothese treffe nicht zu. Im einzelnen interpretieren wir die Irrtumswahrscheinlichkeiten wie folgt:

5,0% = schwache statistische Sicherung; kann nur als Hinweis aufgefaßt werden;

1,0% = ausreichende statistische Sicherung;

0,1% = hohe statistische Sicherung.

Am wesentlichsten für die statistische Interpretation der Versuchsergebnisse ist die Aussage über die Hypothese H_2 . Führt die Varianz-Analyse zur Verwerfung dieser Hypothese, so muß durch die Prüfung zusätzlicher Hypothesen untersucht werden, in welcher Weise sich die 6 Verfahren des Versuches unterscheiden. Zur Formulierung dieser Hypothesen führen wir für die Parameter, welche die Wirkung der Verfahren charakterisieren, neue Bezeichnungen ein. Es soll bedeuten für die

reine Farbstoff-Quaddel $V_k^{(E)}$ den Parameter, welcher das Verhalten der Kontroll-Quaddel charakterisiert, $V_1^{(E)}$ den Parameter, welcher das Verhalten dieses Quaddel-Typs zur 1. Versuchszeit charakterisiert und $V_2^{(E)}$ den Parameter, welcher das Verhalten dieses Quaddel-Typs zur 2. Versuchszeit charakterisiert.

Für die

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel sollen $V_k^{(H)}$, $V_1^{(H)}$ und $V_2^{(H)}$ die analogen Bedeutungen haben.

Es wird nun angenommen, daß jeder dieser Parameter sich selber additiv aus weiteren Parametern zusammensetzt und zwar in folgender Weise:

$$\begin{aligned} V_k^{(E)} &= W^{(E)} + W_k^{(E)} & ; & \quad V_k^{(H)} = W^{(H)} + W_k^{(H)} \\ V_1^{(E)} &= W^{(E)} + W_T^{(E)} + W_1^{(E)} & ; & \quad V_1^{(H)} = W^{(H)} + W_T^{(H)} + W_1^{(H)} \\ V_2^{(E)} &= W^{(E)} + W_T^{(E)} + W_2^{(E)} & ; & \quad V_2^{(H)} = W^{(H)} + W_T^{(H)} + W_2^{(H)} \end{aligned}$$

Mit Hilfe dieser Zerlegung der Parameter, welche in die Hypothese H_2 eingehen, werden neue Hypothesen geprüft, die als Teil-Hypothesen der Hypothese H_2 aufzufassen sind. Diese Hypothesen lauten:

Hypothese H_{21} : Im Mittel unterscheidet sich das Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel nicht von demjenigen der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel, d.h. es gilt

$$W(E) = W(H).$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Quaddel-Typen" geprüft.

Hypothese $H_{22}^{(E)}$: Für die reine Farbstoff-Quaddel unterscheidet sich das Spreading zu den beiden Versuchszeiten im Mittel nicht von demjenigen der Kontroll-Quaddel, d.h. es ist

$$w_k^{(E)} = w_T^{(E)}.$$

Diese Hypothese wird mit Hilfe der Varianz-Komponente "Zwischen Kontrolle und Versuchszeiten" geprüft.

Hypothese $H_{23}^{(E)}$: Zu den beiden Versuchszeiten unterscheidet sich das Spreading der reinen Farbstoff-Quaddel nicht, d.h. es ist

$$w_1^{(E)} = w_2^{(E)}.$$

Zur Prüfung dieser Hypothese wird die Varianz-Komponente "Zwischen Versuchszeiten" verwendet.

Für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel werden die analogen Hypothesen $H_{22}^{(H)}$ und $H_{23}^{(H)}$ geprüft; hierzu werden die entsprechenden Varianz-Komponenten verwendet.

Die 5 Varianz-Komponenten, die zur Prüfung der soeben formulierten fünf Teil-Hypothesen der Hypothese H_2 herangezogen werden, bilden insgesamt eine vollständige orthogonale Zerlegung der Varianz-Komponente "Zwischen Verfahren".

Eine direkte Schätzung der Parameter, welche zu den einzelnen Verfahren gehören, ist nicht möglich. (Die Gründe hierfür können hier nicht erörtert werden.) Geschätzt kann lediglich die Differenz werden, die zwischen den Parametern besteht, die zu zwei verschiedenen Verfahren gehören. Bedeutet hierzu $\bar{x}_i$ für das Verfahren i den Mittelwert der beobachteten Meßwerte der 6 Tiere, $\bar{x}_k$ den entsprechenden Mittelwert für das Verfahren k, so ist die Mittelwertsdifferenz $\bar{c}_{ik} = \bar{x}_i - \bar{x}_k$ ein Schätzwert für die Differenz zwischen den beiden Parametern V_i und V_k .

Im Hinblick darauf, daß bei der hier vorliegenden Fragestellung im wesentlichen nur die Abweichung von den zugehörigen Kontroll-Quaddeln interessiert, haben wir lediglich die Mittelwertsdifferenzen zwischen den einzelnen Versuchszeiten und den zugehörigen Kontroll-Quaddeln für jeden Quaddel-Typus errechnet:

$$d(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(K).$$

$\bar{x}(t)$ = Mittelwert des betreffenden Quaddel-Typs zur Versuchszeit t ;

$\bar{x}(K)$ = Mittelwert der Kontroll-Quaddel des betreffenden Quaddel-Typs)

Als Schätzwert für die reale Differenz zwischen den Parametern, ist die Mittelwertsdifferenz mit einem Schätzfehler behaftet, der sich aus dem Versuchsfehler errechnen läßt. Dieser Schätzfehler wurde von uns in Form des 95%-Konfidenzbereiches ermittelt.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Ergebnisse der Varianz-Analysen sind im oberen Teil der Tabellen 6 - 10 angegeben. Die Abkürzungen in den Schemata der Varianz-Analysen haben folgende Bedeutung:

- n : Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
- SAQ : Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- MAQ : Mittleres-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- $F_{\text{emp.}}$: Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der Rest-Varianz (nur angegeben, wenn die Varianz-Komponente zahlenmäßig größer ist als die Rest-Varianz);
- p : Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung, zugleich Irrtumswahrscheinlichkeit beim Verwerfen der zugehörigen Hypothese (nur angegeben wenn p niedriger als 5,0% ist).

Im Fuße der Varianz-Analysen haben wir die Schätzung s der Versuchsstreuung angegeben; aus ihr wurden die 95%-Vertrauensintervalle für die Mittelwertsdifferenzen $d(t)$ errechnet.

Im zweiten Teil der Tabellen sind für jede Versuchsstufe (Verfahren) die Mittelwerte aus den Beobachtungen an allen 6 Tieren angegeben (Spalte $\bar{x}$). Die Spalte $d(t)$ enthält die beobachteten Mittelwertsdifferenzen einschließlich der zugehörigen 95%-Vertrauensintervalle.

In der Spalte "Sicherung" wurde angegeben, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit die Aussage behaftet ist, daß $d(t) \neq 0$ sei. Diese Angabe erfolgte jedoch nur, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit maximal 5% betrug.

Die Spalte "Hemmung" schließlich enthält die Angabe über die prozentuale Hemmung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel, die in üblicher Weise errechnet wurde.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Die Varianz-Analysen, Mittelwerte, Mittelwertsdifferenzen und die beobachteten Hemmungen des Spreadings der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln sind in den Tabellen 6 bis 10 angegeben.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im einzelnen wie folgt zu interpretieren.

Versuchsreihe 1

Für beide Quaddeltypen liegt eine statistisch hoch gesicherte Hemmung ihres Spreadings zu den Beobachtungszeiten 15 und 90 Minuten nach Applikation vor. Für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel ist die beobachtete Hemmung zum Zeitpunkt 90 Minuten in statistisch gesicherter Weise niedriger als zum Zeitpunkt 15 Minuten.

Versuchsreihe 2

Auch hier liegt für die beiden Quaddel-Typen eine statistisch gesicherte Hemmung im Spreading zu den beiden Beobachtungszeiten vor. Die Hemmung des Spreadings der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel ist jedoch deutlich niedriger als in der Versuchsreihe 1; die vorherige Applikation von Pendiomid bewirkt somit eine teilweise Blockade der reinen Adrenochrom-Hemmung.

Versuchsreihe 3

Für keinen der beiden Quaddel-Typen läßt sich in dieser Versuchsreihe eine statistisch faßbare Hemmung im Spreading der entsprechenden Quaddel nachweisen. Die bei intakten Tieren nach Applikation von Adrenochrom beobachtete Hemmung im Spreading wird somit durch die Adrenalektomie aufgehoben.

Versuchsreihe 4

In dieser Versuchsreihe läßt sich lediglich zum Zeitpunkt 90 Minuten eine statistisch schwach gesicherte Hemmung im Spreading der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel feststellen. Diese Hemmung ist jedoch deutlich niedriger als diejenige, die bei intakten Tieren unter der entsprechenden Versuchsanordnung beobachtet wurde (siehe Versuchsreihe 2).

Versuchsreihe 5

Für keinen der beiden Quaddel-Typen läßt sich in dieser Versuchsreihe eine statistisch faßbare Hemmung im Spreading der entsprechenden Quaddel nachweisen.

Tabellenanhang

	I	II	III	IV	V	VI
F _v	132	135	134	129	136	131
FH _v	220	205	214	219	215	222
F ₁	125	114	123	118	121	119
FH ₁	151	148	147	145	140	150
F ₂	127	124	126	125	121	123
FH ₂	170	163	166	160	157	164

Tabelle 1

Intakte Tiere, Adrenochrom 6γ/100 g Tier i.v.

	I	II	III	IV	V	VI
F _v	165	158	159	157	136	147
FH _v	235	219	228	231	220	230
F ₁	126	131	130	125	120	128
FH ₁	205	201	196	194	182	187
F ₂	144	139	134	129	128	130
FH ₂	210	181	200	192	190	206

Tabelle 2

Intakte Tiere; Pendiomid 5 mg/100 g Tier i.v.
nach 30 Minuten Adrenochrom 6γ/100 g Tier i.v.

	I	II	III	IV	V	VI
F _v	132	132	125	138	129	130
FH _v	220	225	217	218	220	227
F ₁	136	124	141	132	131	136
FH ₁	210	215	221	220	220	219
F ₂	124	128	133	141	126	128
FH ₂	215	230	227	229	231	227

Tabelle 3
adrenalektomierte Tiere, Adrenochrom 6 γ /100 g
Tier i.v.

	I	II	III	IV	V	VI
F _v	149	141	155	146	139	148
FH _v	261	260	257	250	255	253
F ₁	140	160	148	145	142	145
FH ₁	254	248	250	259	251	247
F ₂	148	134	142	142	129	138
FH ₂	235	243	239	263	253	245

Tabelle 4
adrenalektomierte Tiere, Pendiomid 5 mg/100 g Tier
i.v. nach 30 Minuten Adrenochrom 6 γ /100 g Tier i.v.

	I	II	III	IV	V	VI
F _v	138	151	150	150	146	146
FH _v	230	237	252	231	247	240
F ₁	137	140	156	133	143	145
FH ₁	227	239	242	240	243	245
F ₂	135	132	152	149	147	147

Tabelle 5

adrenalektomierte Tiere, Ergotamin 0,8 mg/100 g

Tier s.c. nach 20 Minuten Adrenochrom 6 γ /100 g

Tier i.v.

V e r s u c h s r e i h e 1

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	P
Zwischen Tieren	5	163,81	32,76	2,39	-
Zwischen Verfahren	5	38.241,81	7.648,36	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	65,14	13,03	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	22.151,36	22.151,36	100,00	0,1%
Zw. Kontr.u.Vers.-Z. (F)	1	455,11	455,11	33,20	0,1%
Zw. Vers.-Zeiten (F)	1	56,33	56,33	4,11	-
Zw. Kontr.u.Vers.-Z. (FH)	1	14.762,25	14.762,25	100,00	0,1%
Zw. Vers.-Zeiten (FH)	1	816,75	816,75	59,57	0,1%
Rest-Varianz	20	274,21	13,71		

Gesamt-Varianz 35 38.744,97

Versuchsstreuung s = 3,7041

Versuchsstufe	$\bar{x}(t)$ mm ²	$d\bar{x}(t)$ mm ²	Hemmung %	Sicherung %
F _v	133			
F ₁₅	120	-13 ± 4,5		0,1%
F ₉₀	124	- 9 ± 4,5		1,0%
FH _v	216			
FH ₁₅	147	-69 ± 4,5	76,5%	0,1%
FH ₉₀	163	-53 ± 4,5	58,2%	0,1%

Tabelle 6

V e r s u c h s r e i h e 2

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	F
Zwischen Tieren	5	1.035,14	207,03	5,72	1,0%
Zwischen Verfahren	5	47.821,14	9.564,23	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	223,14	44,63	1,23	-
Zw. Quaddel-Typen	1	41.412,25	41.412,25	100,00	0,1%
Zw.Kontr.u.Vers.Z. (F)	1	2.177,78	2.177,78	60,19	0,1%
Zw. Vers.Zeiten (F)	1	161,33	161,33	4,46	0,1%
Zw.Kontr.u.Vers.Z. (FH)	1	4.053,44	4.053,44	100,00	0,1%
Zw. Vers.Zeiten (FH)	1	16,33	16,33	-	-
Rest-Varianz	20	723,55	36,18		
Gesamt-Varianz	35	49.802,97			

Versuchsstreuung $s = 6,0129$

Versuchsstufe	$\bar{x}(t)$ mm ²	$d\bar{x}(t)$ mm ²	Hemmung %	Sicherung %
F _v	154			
F ₁₅	127	-27 ± 7,2		0,1%
F ₉₀	134	-20 ± 7,2		0,1%
FH _v	227			
FH ₁₅	194	-33 ± 7,2	37,1%	0,1%
FH ₉₀	197	-30 ± 7,2	34,5%	0,1%

Tabelle 7

V e r s u c h s r e i h e 3

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	160,25	32,05	1,20	-
Zwischen Verfahren	5	73.631,58	14.726,32	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	95,25	19,05	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	73.350,78	73.350,78	100,00	0,1%
Zw. Kontr. u. Vers. Z. (F)	1	1,78	1,78	-	-
Zw. Vers.-Zeiten (F)	1	33,33	33,33	1,25	-
Zw. Kontr. u. Vers. Z. (FH)	1	2,78	2,78	-	-
Zw. Vers.-Zeiten (FH)	1	243,00	243,00	9,11	1,0%
Rest-Varianz	20	533,67	26,68		
Gesamt-Varianz	35	74.420,75			

Versuchsstreuung $s = 5,1640$

Versuchsstufe	$\bar{x}(\frac{t}{2})$ mm ²	$d\bar{x}(t)$ mm ²	Hemmung %	Sicherung %
F _v	131			
F ₁₅	133	+ 2 ± 6,2		-
F ₉₀	130	- 1 ± 6,2		-
FH _v	221			
FH ₁₅	218	- 3 ± 6,2	4,1%	-
FH ₉₀	227	+ 6 ± 6,2	-6,0%	-

Tabelle 8

V e r s u c h s r e i h e 4

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	12 ^a ,22	25,84	-	-
Zwischen Verfahren	5	104.200,22	20.840,04	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	362,89	72,58	1,70	-
Zw. Quaddel-Typen	1	103.684,00	103.684,00	100,00	0,1%
Zw. Kontr. u. Vers. Z. (F)	1	51,36	51,36	1,20	-
Zw. Vers.-Zeiten (F)	1	184,08	184,08	4,31	-
Zw. Kontr. u. Vers. Z. (FH)	1	200,69	200,69	4,70	5,0%
Zw. Vers.-Zeiten (FH)	1	80,08	80,08	1,88	-
Rest-Varianz	20	854,23	42,71		

Gesamt-Varianz 35 105.546,56

Versuchsstreuung s = 6,5363

Versuchsstufe	$\bar{x}(t)$ mm ²	$d\bar{x}(t)$ mm ²	Hemmung %	Sicherung %
F _v	146			
F ₁₅	147	+ 1 ± 7,9		-
F ₉₀	139	- 7 ± 7,9		-
FH _v	256			
FH ₁₅	252	- 4 ± 7,9	4,0%	-
FH ₉₀	246	-10 ± 7,9	8,6%	5,0%

Tabelle 9

V e r s u c h s r e i h e 5

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen Tieren	5	1.027,81	205,56	5,79	1,0%
Zwischen Verfahren	5	84.351,14	16.870,23	100,00	0,1%
Zwischen Lokalisationen	5	90,81	18,16	-	-
Zw. Quaddel-Typen	1	84.196,69	84.196,69	100,00	0,1%
Zw. Kontr. u. Vers. Z. (F)	1	58,78	58,78	1,65	-
Zw. Vers.-Zeiten (F)	1	5,33	5,33	-	-
Zw. Kontr. u. Vers. Z. (FH)	1	20,25	20,25	-	-
Zw. Vers.-Zeiten (FH)	1	70,08	70,08	1,97	-
Rest-Varianz	20	710,55	35,53		

Gesamt-Varianz 35 86.180,31

Versuchsstreuung $s = 5,9628$

Versuchsstufe	$\bar{x}(t)$ mm	$d\bar{x}(t)$ mm ²	Hemmung %	Sicherung %
F _v	147			
F ₁₅	142	- 5 ± 7,2		-
F ₉₀	144	- 3 ± 7,2		-
FH _v	240			
FH ₁₅	239	- 1 ± 7,2	0,2%	-
FH ₉₀	244	+ 4 ± 7,2	-4,9%	-

Tabelle 10

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit den Arbeiten von J a n s e n ²⁰ und S c h m i t t ²¹, daß Adrenochrom als Metabolit des Adrenalins ebenfalls wie dieses einen hemmenden Einfluß auf das Spreading der Hyaluronidase ausübt.

Für den Wirkungsablauf dieser Hyaluronidasehemmung durch Adrenochrom müssen verschiedene Möglichkeiten diskutiert werden. Adrenochrom könnte hormonell direkt wie Adrenalin wirken, d. h. der Angriffspunkt läge peripher des Nebennierenmarks. In diesem Falle müßte die Adrenalectomie und ein Ganglienblocker ohne Einfluß auf die Wirkung von parenteral appliziertem Adrenochrom sein.

Ein solcher Wirkungsablauf wird jedoch durch die vorliegenden Versuche unwahrscheinlich gemacht, da in Versuchsreihe 3 die Adrenalectomie die hyaluronidasehemmende Wirkung, die Adrenochrom bei intakten Ratten gezeigt hatte, vollständig aufhob und in Versuchsreihe 2 die vorherige Gabe von Pendiomid als einem Ganglienblocker bei intakten Tieren in Übereinstimmung mit J a n s e n ²⁰ eine teilweise Aufhebung der Hyaluronidasehemmung durch Adrenochrom erbrachte.

K u r z ²⁴ fand, daß Pendiomid allein bei intakten Ratten eine Hemmung des Hyaluronidase-Spreadings verursacht. Bei adrenalectomierten Tieren konnte er wegen der stark variierenden Einzelergebnisse keine statistisch gesicherte Hemmung feststellen. Es liegt der Gedanke nahe, ob nicht Pendiomid neben der Blockade des Nebennierenmarks selbst direkt die beobachtete Hemmung der Hyaluronidase verursachte.

Als weitere Wirkungsmöglichkeit des Adrenochroms muß diskutiert werden, ob Adrenochrom bei Überschreitung eines gewissen Blutspiegels das Nebennierenmark reaktiv zur Abgabe von Adrenalin veranlaßt. Eine zusätzliche Katecholaminausschüttung durch parenterale Zufuhr von Adrenalin wird im Gegensatz zu anderen Autoren auch von F o r s t ²⁵ und M a l o r n y ²⁶ angenommen. Untersuchungen von M a t h i e s und S c h l i e r f ²⁷ sowie K a i n z ²⁸ haben sie weiterhin wahrscheinlich gemacht. Die Hyaluronidasehemmung

bei einem solchen Wirkungsablauf wäre durch Adrenalektomie und Adrenolytika zu blockieren. Wie o.a. war in Versuchsreihe 3 dieser Arbeit die hemmende Wirkung des Adrenochroms durch die Adrenalektomie aufgehoben, dieses Ergebnis steht allerdings im Gegensatz zu S c h m i t t ²¹, der eine geringe Hemmung der Hyaluronidase durch Adrenochrom bei adrenalektomierten Ratten fand, wobei allerdings an die Möglichkeit einer unvollständigen Adrenalektomie gedacht werden muß.

J a n s s e n ²⁰ fand bei intakten Ratten eine teilweise Aufhebung der hyaluronidasehemmenden Wirkung des Adrenochroms durch vorherige Gabe des Adrenolytikums Ergotamin. Für diese Ergebnisse gilt das gleiche, wie schon zur Kritik der Versuchsreihe 2 dieser Arbeit gesagt, da L o e n i c k e r ²⁹ in Versuchen mit Ergotamin an intakten Ratten eine Hyaluronidasehemmung durch Ergotamin festgestellt hat.

Als dritte Wirkungsmöglichkeit muß an eine Stimulierung des Nebennierenmarks durch vermehrtes Auftreten von Adrenochrom im Blut gedacht werden. Diese Ausschüttung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark über eine Stimulierung des Nebennierenmarks wäre durch Adrenalektomie und Ganglienblocker zu blockieren, die Wirkung des ausgeschütteten Adrenalins in der Peripherie müßte durch Adrenolytika aufgehoben werden können.

Die Tatsache, daß Pendiomid bei J a n s s e n ²⁰ und in der vorliegenden Arbeit nur eine teilweise Blockade der Adrenochromwirkung erbrachte und bei J a n s s e n ²⁰ auch Ergotamin nur eine teilweise Blockade zeigte, läßt auf einen außerordentlich komplizierten Wirkungsablauf der Hemmung des Hyaluronidasespreadings durch Adrenochrom schließen.

Alle bisher vorliegenden Untersuchungen reichen nicht für eine klare Beweisführung in der Entscheidung für einen der beiden zuletzt diskutierten Wirkungsmöglichkeiten aus. Es erscheint aber prinzipiell möglich, durch die Adrenalektomie die Adrenochromwirkung aufzuheben, womit eine direkte, adrenalingleiche Wirkung des Adrenochroms unwahrscheinlich wird.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit S c h m i t t ²¹ und J a n s s e n ²⁰ gezeigt werden, daß Adrenochrom bei intakten Ratten einen statistisch gesicherten hemmenden Einfluß auf das Spreading der Hyaluronidase besitzt.

Der Ganglienblocker Pendiomid erbrachte bei intakten Ratten nur eine teilweise Blockade der Adrenochromwirkung auf die Hyaluronidaseaktivität.

In den Versuchen an adrenaletomierten Tieren war der hyaluronidasehemmende Effekt des Adrenochrom aufgehoben. Auch konnte der Ganglienblocker Pendiomid und das Sympathicolyticum Ergotamin-tartrat keinen signifikanten Einfluß auf die Hyaluronidaseaktivität ausüben. Die diesen Ergebnissen zugrundeliegenden Mechanismen wurden diskutiert.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H., Biechele, I. u. Hartmann, M.: Ärztl. Forsch.
XIV, 1/160 (1960)
- 2) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35, 1676 (1957)
- 3) Mathies, H., Glück, A., Poulantzas, J. u. Schmidt, D.:
Med. Exp. 1, 64 (1959)
- 4) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Arzneimittelforsch. 2, 576 (1959)
- 5) Mathies, H.: Zschr. ges. exp. Med. 131, 118 (1959)
- 6) Mathies, H.: Med. Mschr. 12, 685 (1958)
- 7) Mathies, H. u. v. Werther, G.: Zschr. angew. Bäder-Klimahk.
5, 503 (1958)
- 8) Mathies, H., Fuchs, E. u. Hiekmann, D.: Fund. baln.-bioklim.
1, 433 (1960)
- 9) Mathies, H. u. Aschtiany, A.: Med. Welt 19, 1070 (1960)
- 10) Mathies, H. u. Lutz, D.: Arzneimittelforsch. 10, 689 (1960)
- 11) Mathies, H. u. Krott, M.: Ärztl. Forsch. XVI, 1/521 (1960)
- 12) Mathies, H.: Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)
- 13) Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)
- 14) Sayers, G. u. Sayers, M.: Endocrinology (Springfield) 40, 256 (1947)
- 15) Domenjoz, R.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 225, 14 (1955)
- 16) Mathies, H.: Arch. int. pharmacodyn. CXXIII, 304 (1959)
- 17) Mathies, H., Oestreich, G. u. Schwalbach, K.: in Vorbereitung
- 18) Mathies, H. u. Schlierf, G.: Med. Exp. 2, 334 (1960)
- 19) Mathies, H.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 240, 31 (1960)
- 20) Janssen, G.: Diss. München 1962
- 21) Schmitt, H.: Diss. München 1961
- 22) Wilhelmi, G.: zit. Domenjoz (15)
- 23) Madinaveitia, J.: Biochemic J. 32, 1806 (1938)
- 24) Kurz, H.: Diss. München 1963
- 25) Forst, A.W.: persönliche Mitteilung
- 26) Malorny, G.: Dtsch. med. Journ. 4, 1 (1955)
- 27) Schlierf, G.: Diss. München 1961
- 28) Kainz, A.: Diss. München 1961
- 29) Loenicker, E.: Diss. München 1962

Herrn Prof. Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Herrn Dr. H. Mathies danke ich für seinen Rat bei der Durchführung und Auswertung der Versuche. Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich bin ich für die statistische Bearbeitung der Versuchsergebnisse dankbar.

Am 10.6.1936 wurde ich als Sohn des Facharztes für Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten Dr. med. Dietrich Schultze und dessen Ehefrau Edda geb. Stadie in Hildburghausen in Thüringen geboren.

Von 1942 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Hildburghausen. Im September 1948 wechselte ich nach Bayern über und trat in die 2. Klasse des Gymnasium Casimirianum in Coburg ein. Bis 1955 war ich Schüler dieser Anstalt. Das Abitur bestand ich am 18.7.1956 am Deutschen Gymnasium in Coburg.

Im Wintersemester 1956/57 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität zum Studium der Medizin. Das Physikum bestand ich am 2.5.1959 an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel. Die ärztliche Prüfung habe ich am 31.7.1962 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München abgelegt.

